

DINAMICA MARKERILOR REMODELĂRII OSOASE ÎN OSTEOPOROZA PRIMARĂ ȘI SECUNDARĂ ȘI INFLUENȚA BIOREMEDIILOR DE ORIGINE ALGALĂ

Valentin Gudumac, Veronica Sardari, Olga Tagadiuc, Lilia Andronache
Laboratorul Biochimie al Laboratorului Central Științific al USMF „Nicolae Testemițanu”

Summary

The dynamics of the bone remodelling markers in primary and secondary osteoporosis and under the influence of bioremedies of algal origin

The action of some bioremedies of algal origin with different content of organically linked Zn on activities of the bone tissue, specific enzymes such as thermolabile alkaline phosphatase and tartrate-resistant acid phosphatase was investigated in primary and secondary experimental osteoporosis at 1.5, 3 and 6 months. Primary osteoporosis was provoked by ovariectomy and secondary osteoporosis was induced by prednisolon injections. The experimental investigations revealed osteoregenerative effect of the studied preparations manifested by the elevation of thermolabile alkaline phosphatase activity.

Rezumat

S-a studiat acțiunea unor bioremedii de origine algală cu un conținut divers de Zn legat organic în osteoporoza experimentală (OP) primară și secundară în dinamică la 1,5; 3 și 6 luni asupra activității enzimelor specifice țesutului osos – fosfatazei alcaline termolabile și fosfatazei acide tartratrezistente. OP experimentală primară a fost reprodusă prin ovariectomie, iar cea secundară prin introducerea prednisolonului. În urma investigațiilor experimentale s-a depistat efectul osteoregenerativ al preparatelor cercetate, ceea ce se manifestă prin creșterea activității fosfatazei alcaline termolabile.

Actualitatea temei

Metabolismul osos reprezintă îmbinarea a două procese antagoniste – resorbția osului vechi, efectuată de osteoclaste, și formarea osului nou, realizată de osteoblaste. Aceste procese, intim legate, sunt reglate de diferiți factori hormonal, umoral și tisulari. Ele formează baza reînnoirii (remodelării) permanente și dinamice a osului [5]. Actualmente markerii biochimici, concomitent cu biopsia țesutului osos, densitometria osoasă și investigarea cineticii calciului radioactiv, sunt frecvent utilizați în estimarea stării metabolismului osos. Se evidențiază markerii ai osteogenezei, ce caracterizează funcția osteoblastelor, și markerii ai resorbției osoase, ce caracterizează funcția osteoclastelor.

Markerii osteogenezei sunt: fosfataza alcalină termolabilă (FATL), osteocalcina (proteina glă osoasă), propeptidele procologenului de tip I [4]. Markerii resorbției osoase reprezintă: hidroxiprolina, compușii colagenului cu legătură încrucișată – piridinolina și dezoxipiridinolina, telopeptidele N și C terminale ale colagenului de tip I, CrossLaps, fosfataza acidă tartratrezistentă (FATR), conținutul Ca^{2+} în urină [8].

Dintre enzimele, participante în metabolismul fosforic al țesutului osos, fac parte fosfataza alcalină (FAI), fosfataza acidă (FAc) și pirofosfataza anorganică.

Fosfataza alcalină (și anume izoenzima ei termolabilă) – (FATL) joacă un rol important în fiziologia și în patologia țesutului osos, participând în formarea nucleelor de cristalizare a osului și transpunând grupele PO_4^{3-} de la ester la acceptorul matricei organice. Ca parte componentă a enzimelor lizozomale, fosfataza acidă este concentrată, în special, în osteoclaste și

în macrofage, participă nemijlocit în resorbția osului și asigură hidroliza esterilor hexozofosforici cu eliberarea ionilor-fosfat în mediu acid [1;6;14].

În prezent este cunoscut efectul unor biopreparate de origine algală (BP) cu diferite efecte terapeutice [9;10].

În literatura accesibilă lipsesc date referitoare la influența biopreparatelor de origine algală asupra markerilor remodelării osoase, în țesutul osos, în OP experimentală. Reieșind din acestea, am considerat oportun a studia modificările markerilor metabolismului osos: fosfataza alcalină termolabilă (FATL) și fosfataza acidă tartratrezistentă (FATR) în administrarea biopreparatelor de origine algală cu un conținut divers de Zn, în dinamica evoluției OP experimentale primare și secundare la 1,5; 3 și 6 luni.

Materialul și metodele de investigație

Experimentele au fost efectuate pe 78 de șobolani, femele și masculi maturi, cu masa de 160-250 g.

Osteoporoza primară a fost reproducă la animalele de laborator – șobolanii albi, femele, fără pedigree, prin ovariectomie – metodă clasică și acceptată de mulți cercetători [7].

Osteoporoza secundară a fost provocată la șobolanii masculi, prin injectări subcutanate bisăptămânale de prednisolon, în doză de 10 mg/kilocorp [11].

Animalele au fost divizate în 10 loturi (câte 7-8 în fiecare).

Animalele din *lotul 1* (lotul-martor pentru OP primară) au fost fals operate, adică supuse aceleiași intervenții chirurgicale, dar fără înlăturarea ovarelor.

Lotul 2 (lotul-martor pentru OP secundară) a fost constituit din 7 animale intacte, cărora li s-a introdus subcutanat, bisăptămânal soluție fiziologică (8,5 g/l NaCl) – 1,0 ml/kilocorp.

Lotul 3 a inclus animalele cărora li s-a modelat OP primară prin ovariectomie.

Lotul 4 – OP secundară reproducă prin injectarea prednisolonului, 10 mg/kilocorp dizolvat în soluție fiziologică.

Loturile 5 și 6 au inclus animalele cu OP primară și, respectiv, secundară, cărora li s-a administrat biopreparatul ce conținea 10 μg/ml de zinc (OP+ BP-Zn1).

Loturile 7 și 8 au inclus animalele cu OP primară și secundară + biopreparatul ce conținea 5 μg/ml de zinc (OP + BP-Zn2).

Loturile 9 și 10 au reprezentat animalele cu aceleași forme de OP + biopreparatul de origine algală cu un conținut redus de Zn – 0,2 μg/ml (OP+BP-R).

Prelevarea materialului de cercetare (osul femural) a fost efectuată în dinamică pe parcursul a 1,5; 3 și 6 luni de la debutul experimentului, animalele fiind sacrificate prin decapitare sub narcoză ușoară cu eter.

Osul femural a fost extras, eliberat de țesuturile adiacente și a fost înlăturată măduva osoasă prin spălări repetate cu soluție fiziologică. Ulterior, a fost congelat în azot lichid și supus triturării, în piuliță de porțelan cu pisălog și cântărit pe balanța de torsionare. În calitate de mediu de dispersare a fost utilizată soluția de zaharoză 0,25M (pH 7,4), ce conținea 0,001M EDTA, astfel ca diluția finală a omogenatului să constituie 1:10. Pentru distrugerea completă a membranelor celulare, omogenatul a fost prelucrat cu triton X-100, cu o concentrație finală de 0,1%, și supus ciclurilor repetate de înghețare-dezghețare.

Dozarea activității fosfatazei alcaline termolabile (EC 3.1.3.1) s-a operat conform procedurii descris de Колб В. Г., Камышников В. С., 1982 [13].

Determinarea activității fosfatazei acide tartrat-rezistente (EC 3.1.3.2) s-a efectuat după metoda descrisă de Асатиани В. С., 1969 [12].

Toate determinările biochimice s-au executat după tehnici adaptate pentru aplicarea la analizorul biochimic FP-901 “Labsystems” (Finlanda) și descrise de noi [2;3].

În studiu s-a utilizat preparatul BioR, soluție injectabilă 0,5% (Certificat de înregistrare Nr. 6839 din 22.04.2003, eliberat de MS al RM).

Preparatul BioR obținut conform schemei tehnologice elaborate reprezintă un complex sinergist de principii bioactive – 5-7% aminoacizi determinați în stare liberă, 5-11% incluși în

componenta oligopeptidelor, glucide – 6-10% precum și macro- și microelemente esențiale, inclusiv 0,2 μg/ml Zn legat organic

Compoziția aminoacidă a preparatului se caracterizează prin prezența unei cantități apreciabile de aminoacizi imunoactivi: *acidul asparagic, glutamic, alanina, cisteina, serina, treonina, triptofanul și valina*. Aceștea constituie circa 64-66% din fracția aminoacizilor liberi și cea a oligopeptidelor. Este de menționat conținutul înalt (circa 52%) al acidului glutamic (glutamina) în componenta preparatului. Preparatul BP-Zn1 avea aceeași compoziție ca și Bio-R, dar conținea suplimentar 10 μg/ml, iar BP-Zn2 – 5 μg/ml Zn legat organic.

Rezultatele obținute și analiza lor

Din datele expuse în tabelul 1, constatăm o tendință de creștere nesemnificativă a activității FATL, cu 11%, în osul femural la animalele cu OP primară după 1,5 luni din momentul ovariectomiei, față de valorile înregistrate la șobolanii de referință. E necesar de remarcat că tendința de creștere a fermentului nominalizat se datorează implicării mecanismelor de formare osoasă, constituind un mecanism adaptiv-compensatoriu de menținere a homeostaziei celulare. Se relevă o creștere a activității FATL cu 22%, în grupul supus medicației cu BP-Zn1, și cu 15% sub acțiunea BP-Zn2 și BP-R în raport cu nivelul atestat la animalele intacte. Suscită atenție faptul că FATL manifestă o tendință de creștere a nivelului de enzimoactivitate mai exprimată la medicația cu BP-Zn1.

Tabelul 1

Dinamica activității fosfatazei alcaline termolabile, în țesutul osos, la animalele cu osteoporoză primară și secundară și sub influența biopreparatelor de origine algală (nmol/s.g.prot.)

Grupuri-le de studiu	Termenele de cercetare și formele de osteoporoză					
	1,5 luni		3 luni		6 luni	
	Primară	Secundară	Primară	Secundară	Primară	Secundară
Martor	8,42±0,94 (100%)	7,96±0,76 (100%)	7,14±0,78 (100%)	7,83±0,82 (100%)	7,14±0,75 (100%)	7,39±0,96 (100%)
OP	9,31±0,18 (111%)	3,97±0,38*** (50%)	4,05±0,17** (57%)	4,51±0,28** (58%)	5,13±0,47* (72%)	6,10±1,15 (83%)
OP + BP-Zn1	10,28±0,81 (122%)	4,87±0,75* (61%)	5,13±0,47* (72%)	3,25±0,19*** (42%)	6,47±0,42 (91%)	5,62±0,33 (76%)
OP + BP-Zn2	9,66±0,52 (115%)	7,65±0,65 (96%)	4,93±0,40* (69%)	3,53±0,37*** (45%)	5,87±1,03 (82%)	7,49±0,51 (101%)
OP + BP-R	9,70±0,34 (115%)	4,04±0,13*** (51%)	4,36±0,58* (61%)	5,14±0,41* (66%)	6,38±0,76 (89%)	6,71±0,18 (91%)

Totodată, se decelează o reducere pregnantă cu 50% ($p<0,001$) a enzimoactivității, în grupul de animale cu OP secundară versus grupul de animale intacte.

Datele obținute reliefează că, pentru OP secundară în această perioadă, sub influența BP-R activitatea enzimei vizate practic a rămas staționară în raport cu valorile atestate în lotul cu OP. Sub medicația cu BP-Zn1 și cu BP-Zn2 se constată o creștere continuă a activității enzimei sus-numite până la nivelul înregistrat în lotul-martor. Astfel, activitatea FATL crește cu 23% sub acțiunea BP-Zn1 și cu 93% ($p<0,001$) de BP-Zn2 față de indicii existenți la animalele cu OP. Cele expuse anterior demonstrează cert acțiunea stimuloare osteoregeneratoare a BP studiate, cu precădere a BP-Zn2, manifestată prin creșterea nivelului funcțional al FATL.

În perioada de 3 luni de proces patologic se constată o diminuare pronunțată, statistic concludentă a activității FATL în OP primară, cu 43% ($p<0,01$), și cu 42% ($p<0,01$), în OP secundară, vis-a-vis de parametrii de referință.

În OP primară, sub influența biopreparatului BP-R activitatea enzimei practic rămâne la nivelul atestat la animalele cu OP primară. Sub medicația cu BP-Zn1 și cu BP-Zn2 se denotă o intensificare a enzimooactivității cu 27% ($p<0,05$) și cu 22% versus animalele cu OP.

În cazul OP secundare, în această perioadă a afecțiunii, tratamentul a redus mai pronunțat gradul de inhibiție suscitată de OP: cu 28% ($p<0,01$) – sub influența BP-Zn1; cu 22% – sub acțiunea BP-Zn2; exceptând doar BP-R care manifestă o tendință sesizabilă de majorare cu 14% față de valorile specificate pentru lotul cu OP.

Spre finele perioadei de cercetare (6 luni) se remarcă o tendință de restabilire a enzimooactivității FATL, inferioară totuși celei atestate la animalele de referință: cu 28% ($p<0,05$), pentru OP primară, și cu 17% ($p>0,05$), pentru OP secundară.

Din cele înregistrate investigațional deducem, în OP primară, o tendință de redresare a activității FATL în toate grupurile experimentale supuse tratamentului cu bioremediile testate, exprimată sub acțiunea biopreparatului BP-Zn1, care a reușit să redreseze enzimooactivitatea FATL practic până în limitele valorilor din lotul-martor. La administrarea BP-Zn2 și BP-R se atestă o sporire a gradului de activitate a enzimei date, respectiv, cu 14% și cu 24%, în raport cu OP.

Referitor la OP secundară, în această perioadă de cercetare, tratamentul cu BP-Zn1 a redus gradul de activitate a enzimei cu 24% față de lotul-martor, s-a restabilit enzimooactivitatea către normă la administrarea BP-Zn2 și a rămas inferioară față de cea a animalelor de referință, cu 9%, sub acțiunea BP-R.

Rezumând cele expuse anterior, conchidem că reducerea exprimată, în țesutul osos, a nivelului funcțional a FATL, în toate perioadele de evoluție a procesului patologic în OP secundară și în stadiile intermediară și tardivă în OP primară, se explică prin micșorarea intensității proceselor de formare osoasă în aceste etape, ca rezultat al epuizării mecanismelor adaptiv-compensatorii de remaniere osoasă. La 6 luni de la debutul procesului patologic se constată o tendință de creștere a activității markerului osteogenezei, pentru ambele forme de OP.

Creșterea activității FATL sub acțiunea tratamentului, ne indică acțiunea stimuloare osteoregeneratoare a medicației cu BP studiate.

Tabelul 2

Dinamica activității fosfatazei acide tartratrezistente, în țesutul osos, la animalele cu osteoporoză primară și secundară și sub influența biopreparatelor de origine algală (nmol/s.g.prot.)

Grupuri- le de studiu	<i>Termenele de cercetare și formele de osteoporoză</i>					
	1,5 luni		3 luni		6 luni	
	Primară	Secundară	Primară	Secundară	Primară	Secundară
Martor	0,348±0,06 (100%)	0,269±0,05 (100%)	0,250±0,03 (100%)	0,349±0,03 (100%)	0,250±0,03 (100%)	0,348±0,04 (100%)
OP	0,342±0,04 (98%)	0,144±0,02* (54%)	0,165±0,02* (66%)	0,283±0,03 (81%)	0,271±0,01 (108%)	0,354±0,12 (102%)
OP + BP-Zn1	0,278±0,06 (80%)	0,229±0,11 (85%)	0,198±0,02 (79%)	0,209±0,01*** (60%)	0,242±0,03 (97%)	0,351±0,08 (101%)
OP + BP-Zn2	0,246±0,04 (71%)	0,269±0,09 (100%)	0,175±0,01* (70%)	0,284±0,02 (81%)	0,240±0,03 (96%)	0,299±0,04 (86%)
OP + BP-R	0,287±0,04 (83%)	0,192±0,18 (71%)	0,204±0,02 (82%)	0,265±0,03 (76%)	0,349±0,03* (140%)	0,213±0,08 (61%)

NOTĂ: * - diferență statistic semnificativă cu lotul martor, $p<0,05$;

** - $p<0,01$;

*** - $p<0,001$

Din tabelul 2 constatăm că, în perioada de 1,5 luni de proces patologic în OP primară, enzimaoactivitatea FATR se menține practic în limitele normei. În același timp, în OP secundară s-a înregistrat o suprimare statistic concludentă a potențialului funcțional al fermentului cu 46% ($p<0,05$), în comparație cu animalele intacte.

În OP primară în această perioadă, medicația cu biopreparatele BP-Zn1, BP-Zn2, BP-R reduc neconcludent activitatea catalitică a FATR în toate loturile experimentale cu 20%, 29% și cu 17%, respectiv, vis-a-vis de valorile existente în lotul-martor. Datele investigațiilor experimentale indică efectul de elevare a remanierii osoase, prin suprimarea activității osteoclastice, incitat de aceste preparate în OP primară.

În utilizarea BP-R, BP-Zn1 și BP-Zn2 în OP secundară, activitatea enzimei testate se reorientează spre o amplificare treptată cu 33%, 59% și cu 87%, față de animalele cu patologia provocată. Tratamentul cu BP-Zn2 reușește să amplifice forța catalitică până la normă, ceea ce indică efectul de augmentare a remodelării osoase, suscitată de aceste preparate, prin stimularea activității osteoclastice.

Dinamica ulterioară a parametrului testat arată că, în perioada de 3 luni de OP primară, gradul de activitate a FATR s-a redus cu 34% ($p<0,05$), pe când în OP secundară se instalează o tendință de restabilire a nivelului enzimei date, dar care n-a atins, cu numai 19%, valorile existente în lotul-martor. Administrarea biopreparatelor BP-Zn1, BP-Zn2, BP-R în OP primară înregistrează valori inferioare ale activității enzimei comparativ celor din lotul-martor de animale și constituie 79%, 70% ($p<0,05$) și 82%. Biopreparatul BP-Zn2 menține enzimaoactivitatea la cote minore similare celor apreciate în grupul cu OP primară, pe când bioremediile BP-Zn1 și BP-R manifestă o dinamizare a potențialului funcțional al markerului osteodistrucției cu 20% și cu 24%, respectiv.

În OP secundară, în această perioadă suntem martori ai unei noi diminuări în enzimaoactivitatea FATR sub influența BP-Zn1 – cu 40% ($p<0,001$), iar utilizarea BP-Zn2 și BP-R practic n-a influențat gradul de activitate.

De menționat că, spre finele perioadei de investigație (6 luni), are loc redresarea indicilor de enzimaoactivitate a FATR până la valorile normale în OP secundară și se observă chiar o ușoară tendință de devansare cu 8% în OP primară. Utilizarea remediei BP-Zn1 practic menține în limitele valorilor normale gradul de activitate a enzimei atât în OP primară, cât și în OP secundară. Biopreparatul BP-Zn2 în OP primară, de asemenea, menține activitatea markerului osteodistrucției în limitele normei, pe când în OP secundară diminuează discret amploarea funcțională a fermentului dat cu 14%, față de lotul-martor. Totodată, BP-R în OP primară reușește să amplifice forța catalitică a FATR cu 40% ($p<0,05$), pe când în OP secundară o reduce semnificativ cu 39% față de nivelul inițial.

Rezumând cele expuse, remarcăm că diminuarea activității FATR în țesutul osos, înregistrată în ambele variante de osteoporoză, denotă reducerea proceselor de remodelare osoasă, aceasta fiind mai exprimată în perioada de 1,5 luni, în OP secundară, și în perioada de 3 luni, în OP primară. Rezultatul studiului în perioada de 1,5 luni indică efectul de elevare a remanierii osoase de către biopreparatele cercetate prin suprimarea activității osteoclastice, în OP primară, și prin stimularea activității lor, în OP secundară.

Concluzii

1. În OP primară, indusă prin ovariectomie, se constată o reducere notabilă a proceselor de remodelare osoasă, în perioada de 3 luni de proces patologic, manifestată prin diminuarea activității fosfatazei alcaline termolabile, fosfatazei acide tartrat-rezistente și pirofosfatazei anorganice osoase.
2. În OP secundară prednisolon-indusă, are loc estomparea proceselor de formare osoasă, în decursul primelor 3 luni, mai exprimată la 1,5 luni de la inițierea procesului patologic, fiind determinată de scăderea nivelului de markeri ai remodelării osoase; și o tendință de restabilire a acestor procese la 6 luni de la debutul maladiei.

3. Studiul în dinamică, la 1,5; 3 și la 6 luni de la inițierea procesului patologic denotă caracterul fazic al proceselor de formare osoasă, în OP primară și în cea secundară. Rezultatele obținute indică o intensitate diferită a proceselor de remodelare, în funcție de stadiul de evoluție a procesului patologic. Astfel, etapele inițiale se caracterizează printr-o rată medie a remodelării; la 3 luni de osteoporoză procesele au o intensitate sporită, iar în etapa tardivă se atestă epuizarea ambelor mecanisme de remodelare osoasă.
4. Biopreparatele de origine algală, cu un conținut sporit de Zn organic, manifestă proprietăți osteoregeneratoare pronunțate prin faptul că stimulează eficient activitatea fosfatazei alcaline termolabile, a pirofosfatazei anorganice osoase, prioritar fiind biopreparatul BP-Zn1. Cercetările efectuate confirmă perspectiva utilizării remediilor studiate în calitate de mijloace eficiente de corecție în dereglările metabolice provocate de osteoporoză.

Bibliografie

1. GUDUMAC, VS. *Diagnosticul de laborator al osteoporozei*. Osteoporoza. Elaborare metodică sub redacția Prof. Minodora Mazur, Chișinău, 1999;
2. GUDUMAC, V., BACIU, E., MARIN, V. și al. *Investigații enzimologice*. Elaborare metodică, Chișinău, 2000, 56 p.;
3. GUDUMAC, V., BACIU, E., MARIN V. și al. *Metode de dozare a activității enzimaticе*. Elaborare metodică, Chișinău, 2001, 60 p.;
4. GUNDBERG, CM. *Biochemical markers of bone formation*. Clin. Lab. Med., 2000, vol. 20, no. 3, p. 489-501;
5. HADJIDAKIS, DJ., ANDROULAKIS, II. *Bone Remodeling*. Ann. N. Y. Acad. Sci., 2006, vol. 1092, no. 1, p. 385-396;
6. LAMP, EC., DREXLER, HG. *Biology of tartrate-resistant acid phosphatase*. Leuk Lymphoma, 2000, vol. 39, no. 5-6, p. 477-484;
7. OMI, N., EZAWA, I. *The effect of ovariectomy on bone metabolism in rats*. Bone, 1995, vol. 17, no. 4, p. 163-168;
8. PAGANI, F., FRANCUCCI, CM., MORO, L. *Markers of bone turnover: biochemical and clinical perspectives*. J. Endocrinol. Invest., 2005, vol. 28(10 Suppl), p. 8-13;
9. RUDIC, V., GUDUMAC, V., POPOVICI, M. *Ficobiotehnologie - realizări noi în biomedicină*. Chișinău: Cuant, 1995, 195p.;
10. RUDIC, V. *BioR – Studii biomedicale și clinice*. Chisinau, 2007, 376p.;
11. TKOCZ-KWIATKOWSKA, J., KACZMARCZYK-SEDLAK, I., FOLWARCZNA, J. *Effects of pamidronate on the development of changes in bone mechanical properties and bone structure caused by the administration of prednisolone in rats*. Pol. J. Pharmacol., 1998, vol. 50, p. 253–258;
12. АСАТИАНИ, ВС. *Ферментные методы анализа*. Москва: Наука, 1969, - 740 с.;
13. КОЛЬ, ВЕ., КАМЫШНИКОВ, ВС. *Справочник по клинической химии*. Минск: Беларусь, 1982, 356 с.;
14. ПРОХОНЧУКОВ, АА., ЖИЖИНА, НА., ТИГРАНЯН, РА. *Гомеостаз костной ткани в норме и при экспериментальном воздействии*. Проблемы космической биологии, 1984, Т. 49, с. 1-63;